

Ra Ximhai

Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo
Sustentable

Ra Ximhai
Universidad Autónoma Indígena de México
ISSN: 1665-0441
México

2012

PROTEÓMICA DE LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus* sp.) CULTIVADOS EN MÉXICO, UNA PRIMERA APROXIMACIÓN

Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas; Cristina Alonso-Ojeda y Pedro Antonio García-Saucedo

Ra Ximhai, septiembre - diciembre, año/Vol. 8, Número 3

Universidad Autónoma Indígena de México
Mochicahui, El Fuerte, Sinaloa. pp. 143-157.



e-revist@s

PROTEÓMICA DE LA MADURACIÓN DE FRUTOS DE ZARZAMORA (*Rubus sp.*) CULTIVADOS EN MÉXICO, UNA PRIMERA APROXIMACIÓN

PROTEOMICS OF THE RIPENING OF BLACKBERRY FRUITS (*Rubus sp.*) GROWN IN MEXICO, A FIRST APPROACH

Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas^{1*}; Cristina Alonso-Ojeda²; Pedro Antonio García-Saucedo³.

¹Profesora e Investigadora de Tiempo Completo, Laboratorio de Interacciones Planta Ambiente, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. ²Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fruticultura, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez". ³Profesor de Tiempo Completo, Laboratorio de Bromatología, Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Paseo Lázaro Cárdenas S/N esq. Berlín, Col. Viveros, CP 60190, Uruapan, Michoacán, México.

*Correo electrónico: atchavez@umich.mx

RESUMEN

La producción de zarzamora en México ha aumentado 200 % en la última década. Las principales variedades utilizadas han sido introducidas y su establecimiento bajo las condiciones climáticas de México ha requerido de adaptaciones considerables al manejo agronómico observado en las regiones de origen de las mismas. El reto esencial del manejo de este producto se basa en las características intrínsecas de sus frutos suaves y su corta vida de anaquel, por lo que el conocimiento de su proceso de maduración bajo las condiciones de cultivo en México resulta indispensable para lograr manipular y mejorar la productividad y calidad de los frutos hasta su destino final. Con la intención de abordar en forma inicial esta problemática, se planteó como objetivo de este trabajo establecer las condiciones de protocolos de análisis de proteínas que permitan evaluar los componentes proteicos en frutos de zarzamora durante la maduración. Para lo cual se identificaron seis estadios de maduración de los frutos de la variedad comercial 'Brazos' (considerando desde frutos verdes y con bajo desarrollo, hasta frutos en madurez de consumo), se seleccionó un método de extracción de proteínas y se efectuó un perfil proteico por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Además, se establecieron los requerimientos para la electroforesis bidimensional (2-DE) de los extractos obtenidos, evaluando las condiciones de isoelectroenfoque y métodos de tinción. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó utilizar 400 µg de proteína total en tiras de IPG de 7 cm con un intervalo de pH de 3 a 10, a un voltaje máximo de 50 000 V y tinción con azul de Coomassie. Utilizando el programa KODAK MI versión 4.5, se practicó un análisis preliminar de la distribución y abundancia de los péptidos expresados en los seis estadios de maduración, observando que el estadio 2 presentó el mayor número de puntos peptídicos (158), que el mayor porcentaje de puntos peptídicos en todos los estadios se presentaron en un intervalo de pH de 5.0 a 6.9 y peso molecular de 30 a 50 kDa. Se identificaron cuatro puntos de intensidad similar durante la maduración; sugiriendo su expresión constitutiva, tres de intensidad decreciente; que podrían estar involucrados en procesos iniciales del crecimiento del fruto, cuatro que se inducen durante maduración y seis de intensidad oscilante.

Palabras clave: proteínas, electroforesis desnaturizante, electroforesis bidimensional.

SUMMARY

Blackberry production in Mexico has increased 200 % in the last decade. The main varieties used have been introduced from other countries, and its establishment under the climatic conditions of México has required considerable adaptations to the agronomic management observed in the regions of origin thereof. The essential challenge of managing this product is based on the intrinsic characteristics of its soft fruit and its short shelf life, so that knowledge of their maturation process under their growing conditions in Mexico is imperative to achieve and improve handling productivity and fruit quality unto its final destination. The aim of this work was to first address this problem by establishing the conditions of protocols for the analysis of proteins in blackberry fruits during different ripening stages. To accomplish this goal, six stages of fruit ripening were identified for the commercial variety 'Brazos' (considering a range of development from green, small fruits to fruits fully developed and in harvest maturity), a protein extraction was selected and a protein profile was performed by electrophoresis under denaturing conditions. In addition, requirements were established for two-dimensional electrophoresis (2-DE) of the extracts obtained by evaluating the conditions of isoelectric focusing and staining methods. According to the results obtained, it was determined to use 400 µg of total protein in IPG strips of 7 cm with a pH range of 3 to 10, using a maximum voltage of 50 000 V, and Coomassie blue staining. A preliminary analysis of the distribution and abundance of the peptides expressed in the six stages of maturation was performed using the KODAK MI software version 4.5, and the results showed that the stage 2 presented the highest number of peptide spots (158), the highest percentage of spots at all stages were observed in a pH range of 5.0 to 6.9 and molecular weight of 30 to 50 kDa. We identified four spots of similar intensity, suggesting its constitutive expression, three of decreasing expression; that could be involved in the initial processes of fruit growth, four spots of induced expression, and six of oscillating degrees of expression during ripening.

Key Words: proteins, denaturing electrophoresis, two-dimensional electrophoresis.

INTRODUCCIÓN

La producción de zarzamora en México ha cobrado gran importancia en los últimos años, de 1995 a 2005 la superficie cultivada de esta frutilla se elevó más de 500 %, reportando una producción nacional de 118,421.73 t para el 2008 (SAGARPA, 2009; SNIIM, 2008). En 2010, Michoacán aportó el 95 % de la producción nacional, con cerca de 60,000 t y un valor de producción mayor a 1,357 millones de pesos (SIAP, 2011), las principales variedades cultivadas han sido generadas en el extranjero y han requerido adaptaciones biotecnológicas considerables en su manejo para lograr los rendimientos observados, destacando las variedades “Brazos” y “Tupy” (Muñoz y Juárez, 1995; SAGARPA, 2002; Inforural, 2010).

La zarzamora producida en México es comercializada principalmente como fruto en fresco y su mayor demanda se encuentra en el mercado internacional, por lo que un factor limitante de su comercialización es la conjunción de sus características intrínsecas de frutilla suave, el requerimiento de ser cosechada en madurez de consumo y su corta vida de anaquel, que es menor a ocho días (Piña-Dumoulin *et al.*, 2001). Por lo que para poder conocer y eventualmente manipular las condiciones de manejo postcosecha con el fin de prolongar su vida de anaquel, es necesario comprender el proceso de maduración de los frutos de zarzamora, de manera específica en los frutos introducidos y bajo las condiciones agroclimáticas bajo las cuales se desarrollan en este país.

La zarzamora forma un fruto agregado llamado polidrupa, que posee de pequeños frutos llamados drupelas o mini drupas, cada una con una semilla e insertas en un receptáculo (Hummer, 1996; Bolmgren y Eriksson, 2010).

La maduración de los frutos involucra cambios bioquímicos y fisicoquímicos que generan consecuentes aumentos en talla y peso del fruto, cambios en la tasa respiratoria, en el contenido de agua, transiciones en la pigmentación, textura, así como producción de sabores y aromas altamente distintivos que afectan la palatabilidad de los frutos. La expresión de los genes asociados a estos cambios fisiológicos está regulada por estímulos externos e internos, incluyendo temperatura, iluminación, estatus nutricional, disponibilidad de agua, así como reguladores del crecimiento vegetal (Manning, 1998).

En los frutos llamados climatéricos la acumulación de etileno dispara el proceso de maduración y su tasa endógena puede ser afectada por la concentración exógena, por lo que se considera a este regulador como el blanco para la manipulación de su vida de anaquel (Matas *et al.*, 2009). Por su parte la zarzamora es un fruto no-climatérico, en este tipo de frutos la inducción de la maduración por etileno no existe o no es tan pronunciada y por ello la cosecha debe realizarse hasta alcanzar la madurez de consumo (Srivastava, 2002).

Los primeros esfuerzos por conocer los mecanismos de regulación de los procesos de maduración de frutos fueron enfocados al estudio de la expresión y actividad enzimática de proteínas de pasos específicos en las rutas bioquímicas involucradas en este proceso (Cheng y Breen, 1991; Moyano *et al.*, 1998). Este tipo de información ha sido de gran utilidad para modificar la tecnología de manejo de frutos, con la finalidad de controlar y prolongar la vida de anaquel a través de la alteración de la concentración de proteínas relacionadas con procesos como el ablandamiento de frutos, la regulación de la tasa respiratoria o la acumulación de pigmentos (Mehta *et al.*, 2002; Neily *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011), y su interacción con factores adicionales como su susceptibilidad al ataque por fitopatógenos como *Botrytis cinerea* (Cantu *et al.*, 2008), favoreciendo consecuentemente las condiciones de mercado. Con el desarrollo de la proteómica se desplegaron los límites del estudio y comprensión de la fisiología de la maduración de frutos, enriqueciendo la descripción y comparación global de patrones de expresión génica cuantitativa y funcional, permitiendo analizar y clasificar la dinámica de

expresión de todas las proteínas en frutos de etapas específicas durante el proceso de maduración (Cánovas *et al.*, 2004).

Debido a la diversidad en los tipos de proteínas, ningún método para la preparación de muestras puede ser aplicado en forma general. Cada procedimiento de separación en electroforesis dimensional y bidimensional, basados en su peso molecular (PM) y su punto isoeléctrico (pI), es selecto y específico para cada diversidad química de proteínas. El método universal para el análisis proteico de plantas es fragmentar la investigación en dos categorías esenciales: la primera implica el perfil de proteínas con el objetivo de separar, secuenciar y catalogar todas las proteínas posibles de un proteoma particular, la segunda se denomina proteómica comparativa, que tiene el objetivo de caracterizar diferencias entre poblaciones de proteínas, en este análisis se utiliza la separación por medio de geles SDS-PAGE, que separa a las proteínas por su peso molecular, después se utiliza la separación en 2-DE (Cánovas *et al.*, 2004).

El proceso de maduración en frutos no-climatéricos es menos estudiado que el de frutos climatéricos. De las frutillas, la fresa (*Fragaria* spp.) y la uva (*Vitis* spp.) son quizás las mejor estudiadas en estos términos (Moyano *et al.*, 1998; Bianco *et al.*, 2009; Robinson y Davies, 2000; Ramaschandra *et al.*, 2011); por su parte, los estudios sobre la maduración del género *Rubus* se limitan sobre todo a la frambuesa (*Rubus idaeus*; Jones *et al.*, 2000). En el presente trabajo se muestran las condiciones ensayadas para establecer parámetros de un primer acercamiento al análisis del proteoma de la maduración de frutos de zarzamora, bajo las condiciones de cultivo en Michoacán, como una herramienta para conocer y eventualmente manipular las condiciones de manejo de su cultivo y postcosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio. El material vegetal se colectó del huerto comercial “Vara Azul”, ubicado en la localidad de Caracha, dentro de las coordenadas 19° 43’77” LN y 101° 92’ 49” LO perteneciente al municipio de Ziracuaretiro, Michoacán.

Material vegetal. Los frutos utilizados en el presente trabajo fueron de la variedad comercial ‘Brazos’. Se colectaron muestras de 10 frutos de cada estadio de maduración y se almacenaron a -70 °C hasta su utilización.

Extracción de proteínas. Se evaluaron dos condiciones de extracción, en la primera el tejido se pulverizó en frío y se agregó solución amortiguadora de extracción (tris 50 mM, pH6.8, DTT 100 mM, SDS 2 %, glicerol 10 % y PMSF 5 mM) en relación 3:1 (v:p). En la segunda condición se adicionó polivinilpirrolidona (PVP) 2 % a la solución amortiguadora de extracción. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, se precipitaron 500 µl de sobrenadante con 1 vol de acetona fría, incubando a -20 °C durante 2 h. Se centrifugó durante 30 min y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 600 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -70 °C hasta su utilización. La cuantificación de las proteínas totales se hizo por el método de Bradford (1976), utilizando un espectrofotómetro DU 640 (Beckman).

Electroforesis desnaturizante y electroforesis bidimensional. La electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) se hizo de acuerdo al protocolo de Laemmli (1970), con acrilamida al 12 % y marcador de peso molecular de 220 kDa de BenchMark (Life Technologies, Biorad, USA), la tinción con azul de Coomassie (R-250). Para la electroforesis bidimensional, el isoelectroenfoque (IEF) se llevó a cabo en tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 7 cm (Biorad), ensayando dos protocolos de limpieza del extracto proteico, el primero con el kit 2-D Clean-Up (Amersham Biosciences, Nueva York, USA) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y el otro consistió en precipitar con un volumen de acetona a -20 °C durante 2 h, centrifugar a 12 000 rpm durante 5 min y secar la pastilla (Görg,

et al., 2004). Las pastillas obtenidas de ambos protocolos de limpieza se resuspendieron en 125 μ l de amortiguador de rehidratación (urea 7 M, thiourea 2 M, CHAPS 4 %, anfolitos 0.5 %, TBP 40 mM, Azul de bromofenol 0.002 %) y 1.5 μ l de reactivo de Destreak (Amersham Biosciences, Suecia), se incubaron en agitación durante 2 h y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 5 min, recuperando el sobrenadante. La separación por IEF se llevó a cabo con el equipo PROTEAN IEF Cell (Biorad, USA), para lo cual las tiras se colocaron en contacto con la muestra y se adicionaron 2 ml de aceite mineral, se utilizó el método Running Preset (Bio-Rad, USA) con una rehidratación activa a 50 V por 12 h, seguido de acondicionamiento a 250 V por 15 min, posteriormente se incrementó de manera lineal hasta un máximo de 4000 V, y se mantuvo hasta un voltaje total de 50 000 V, a temperatura constante de 20 °C.

Previo a la electroforesis de segunda dimensión, se equilibraron las tiras de IPG con 2 ml de solución amortiguadora I (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, DTT 2 %) en agitación durante 15 min, posteriormente con 2 ml de amortiguador de equilibrio II (urea 6 M, SDS 2 %, amortiguador tris/HCl 0.05 M, pH 8.8, glicerol 20 %, iodoacetamida 2.5 %) durante 5 min. Se evaluaron las condiciones de enfoque de proteínas más homogéneo a distintos voltajes (35 000, 40 000 y 50 000 V), se llevó a cabo la SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie R-250 de acuerdo a Laemmli, 1970; o con plata, según el protocolo de Gambetti *et al.*, 1981. Los geles teñidos se digitalizaron en un densitómetro GS-800 (Biorad, Francia).

Análisis de puntos peptídicos. Las imágenes de los geles 2-DE se analizaron con el programa Kodak Molecular Imaging versión 4.5 (Kodak). Para estimar el punto isoeléctrico (pI) de las fracciones proteicas, la imagen de cada gel 2-DE fue dividida en los siete intervalos de pH correspondientes a los de las tiras de IEF, el peso molecular (PM) se estimó por referencia al marcador de 220 kDa de BenchMark (Life Technologies). Se editaron las imágenes de cada gel, analizando cada mancha para eliminar los falsos positivos. Se seleccionó una fracción proteica de pI, PM y densidad similares en los seis geles correspondientes a los seis estadios de maduración, considerándola de expresión constitutiva y se le otorgó arbitrariamente un valor mínimo de masa de 1.0 y se le otorgó el número de identificación N000, para utilizarlo como referencia en la estimación de densidad e intensidad de expresión del resto de las manchas de fracciones proteicas en los geles de cada estadio. De esta manera fueron caracterizados todos los puntos de cada gel de acuerdo a su pI, PM y masa, y estos datos se utilizaron para definir el comportamiento de los puntos proteicos durante la maduración de frutos de zarzamora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estadios de maduración identificados en los frutos de zarzamora ‘Brazos’. Se lograron identificar seis estadios de maduración de los frutos de zarzamora ‘Brazos’ con características morfológicamente definidas y contrastantes (Figura 1). En el estadio 1 (E1) los frutos son verdes y sus drupelas se encuentran en las primeras etapas de llenado, su talla corresponde al 40 % del crecimiento final, el crecimiento final se alcanza hasta el estadio 4 (E4), en el que la coloración de los frutos ya es roja en el 90 % de las drupelas. Sin embargo la coloración de las drupelas cambia gradualmente de verde a rojo y finalmente negro durante los seis estadios. Se estableció como estadio 6 (E6) aquel en el que se alcanzó un color negro brillante en el 100 % de las drupelas, característico del punto de madurez de cosecha.







Estadio	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Imagen del fruto						
Color drupelas % crecimiento	100% verdes 40% crec.	80% verdes 70% crec.	60% rojas 90% crec.	90% rojas 100% crec.	100% rojas 100% crec.	100% negras 100% crec.

Figura 1. Estadios de maduración determinados por el color de las drupelas y tamaño del fruto. El porcentaje de color hace referencia al porcentaje mayoritario de drupelas con un mismo color, el porcentaje de crecimiento es respecto al tamaño final del fruto.

Al establecer una escala morfológica de maduración de frutos no climatéricos es importante considerar como uno de los parámetros a la madurez de consumo, aunque la selección de los estadios puede ser variada, se recomienda tomar en cuenta puntos contrastantes de desarrollo del fruto (Manrique, 2001). En frutos de nopal (tuna), algunos autores han considerado tres estadios de maduración, a saber: verde, semimaduro y maduro (Rosas, 2008).

Para el estudio de maduración de frutos de zarzamora se han utilizado diferentes escalas, en una de ellas se consideran cinco estadios de maduración con las características de: M1: menos maduros 50%, M2: cambiantes 60 %, M3: rojos 90 %, M4: negros 90 % y M5: negros 98 % y se reportan las propiedades biomecánicas de estos frutos (Chávez-Franco *et al.*, 2000), sin embargo, las especificaciones de los estados de madurez no corresponden a lo observado en el caso de la maduración de los frutos en el presente trabajo, entre los frutos M1 y los M2 existen diferencias entre tamaños y coloraciones que no se establecen en esta escala, las diferencias entre la categoría de frutos M4 y M5 no se distinguen claramente, finalmente la etapa de maduración más avanzada es descrita como una etapa con drupelas negras en 98 % de la superficie del fruto, pero no consideran un fruto completamente negro.

Por lo que en el presente trabajo se consideró más adecuado establecer mayor número de estadios intermediarios en las primeras etapas de desarrollo del fruto, ubicar estadios de maduración más contrastantes y describir el punto de madurez de cosecha como el estadio de maduración más avanzada.

En otras escalas se han descrito hasta ocho estadios de maduración de zarzamora, basándose en cambios de coloración de las drupelas de los frutos (Esquivel *et al.*, 2008), sin embargo, en esta escala no se describe claramente el estado de crecimiento respecto al crecimiento final del fruto y el número de variaciones en los estados de maduración puede generar confusión, por no ser claramente contrastantes.

Por su parte, en otros estudios de maduración en diversos cultivares de *Rubus* spp. ('Navaho', 'Choctaw', 'Cheyenne' y 'Shawnee') se han establecido estadios de maduración con parámetros más contrastantes (verde, verde-rojo, rojo-verde, moteado, negro brillante y negro mate; Perkins-Veazie *et al.*, 1996; Perkins-Veazie *et al.*, 2000) por lo que en este trabajo se procuró considerar este tipo de descripciones como análogas a las utilizadas para el caso de zarzamora var. Brazos.

La extracción de proteínas de zarzamora no requiere la adición de PVP. La PVP se utiliza ampliamente para disminuir el contenido de compuestos fenólicos que pueden disminuir la concentración o integridad de las proteínas en un extracto. En este caso, la adición de PVP al amortiguador de extracción promovió la generación de precipitados que formaron pastillas

grandes y viscosas, difíciles de resuspender y manejar. Por su parte, las pastillas generadas con el amortiguador sin PVP mantuvieron un alto nivel de pigmentación, pero fueron más compactas y menos viscosas. Ambos tipos de pastilla fueron resuspendidas en 100 μ l de amortiguador de extracción y se utilizaron alícuotas de 10 μ l para la SDS-PAGE. La resolución de las proteínas generó bandas bien definidas y consistentes en el protocolo sin PVP, mientras que los extractos con PVP mostraron una menor concentración de polipéptidos (Figura 2). Estos resultados sugieren que si bien la PVP puede disminuir la oxidación por compuestos fenólicos, en el caso de extractos de frutos de zarzamora, su presencia promueve la formación o retención de polímeros que dificultan su manejo, disminuyendo la eficiencia de extracción de proteínas totales, por lo que se eliminó el uso de PVP en el protocolo de extracción.

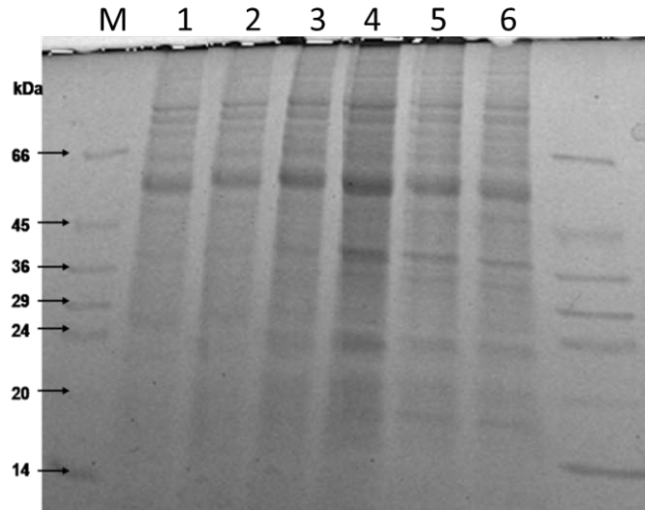


Figura 2. Evaluación de dos condiciones de extracción de proteínas totales de frutos maduros de zarzamora. Extractos de proteínas de frutos en estadio E6 se obtuvieron por el protocolo con uso de PVP (carriles 1 a 3) y sin PVP (carriles 4 a 6). 10 μ l de cada extracto se separaron por SDS-PAGE al 10 %. M, Marcador de peso molecular

Patrón de polipéptidos en SDS-PAGE de frutos durante la maduración. Las proteínas totales de cada uno de los seis estadios de maduración fueron separadas por SDS-PAGE (Figura 3). En el patrón de polipéptidos de frutos de zarzamora se observa una abundancia primordial de fracciones de concentración constante durante los distintos estadios de maduración, que sugieren una expresión constitutiva de los mismos. Sin embargo también hay polipéptidos cuya abundancia se incrementa o disminuye durante la maduración, sobre todo en un intervalo de 14 a 24 kDa, lo cual sugiere una regulación diferencial en la expresión de las mismas.

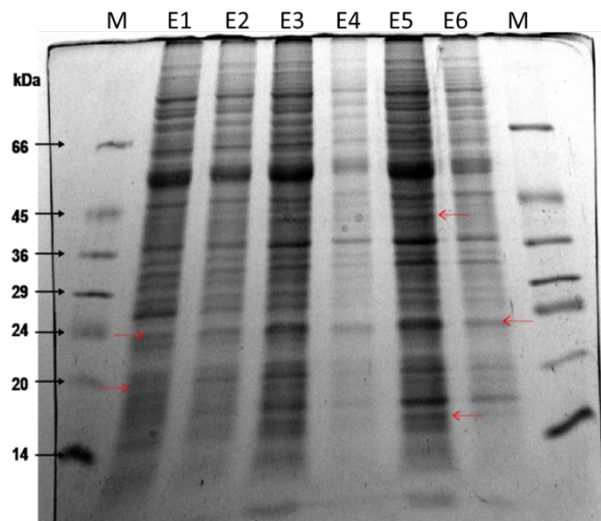


Figura 3. Patrón de proteínas totales de frutos de zarzamora durante distintos estadios de maduración. 20 µg de proteínas totales de cada estadio se separaron en un gel SDS-PAGE al 12 %. E1 a E6; estadios de maduración 1 a 6. M, Marcador de peso molecular. Las flechas rojas muestran fracciones de expresión diferencial en los distintos estadios.

Condiciones para separar las proteínas de frutos de zarzamora en 2-DE. Para el IEF se requiere una calidad de extracto proteico que permita la resolución adecuada, para lo cual se evaluaron dos protocolos de limpieza. Una alícuota de 80 µg de proteína total se procesaron con el kit 2-D Clean-Up Amersham Biosciences, de acuerdo a las indicaciones del fabricante; asimismo, una alícuota de la misma concentración se precipitó con acetona al 40 %. A ambas alícuotas se les agregó amortiguador de rehidratación y se llevó a cabo el IEF a 35 000 V durante 24 h y posteriormente la SDS-PAGE. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa en los geles, respecto a la limpieza de las muestras (Figura 4).

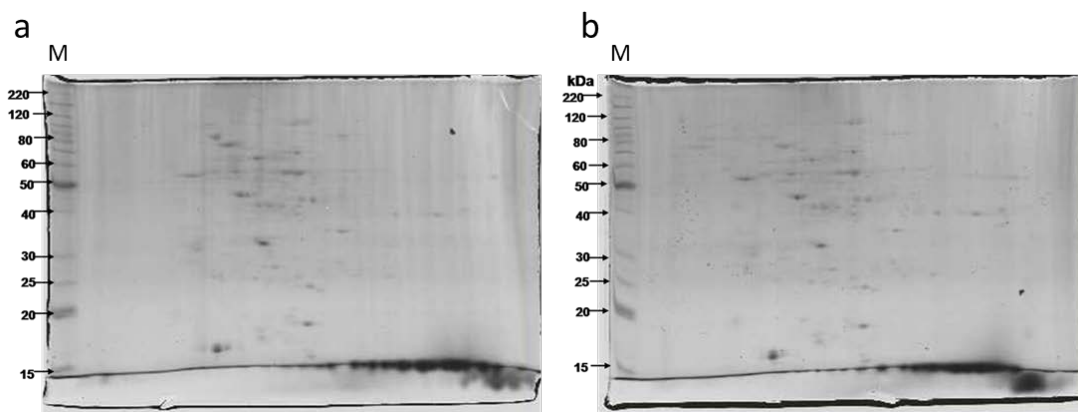


Figura 4. Evaluación de condiciones de limpieza de extractos de proteínas de zarzamora para su análisis por 2-DE. 80 µg de proteínas totales del extracto E6 se procesaron para su limpieza con el Kit 2-D Clean-Up de AmershamBiosciences (a), o con acetona (b). El IEF fue en tiras de IPG de 7 cm, pH 3 a 10, a 35 000 V durante 24 h, el SDS-PAGE al 12 %, teñidos con azul de Coomassie. M, marcador de peso molecular.

Adicionalmente se evaluaron tres concentraciones de proteína total separada por IEF a dos condiciones de voltaje, a saber: 1) 100 µg de proteína total a 40 000 V; 2) 100 µg de proteína total a 50 000 V; 3) 200 µg de proteína total a 40 000 V, 4) 200 µg de proteína total a 50 000 V y 400 µg de proteína total a 50 000V. Los resultados mostraron un enfoque adecuado a 50 000 V (Figura 5), sin embargo las manchas proteicas resueltas en los geles 2-DE todavía se observaron tenues, que podrían sugerir deficiencias en la tinción utilizada. También se valoró el uso de dos protocolos de tinción, con azul de Coomassie y con plata. En los geles teñidos con plata se observó una sobresaturación generando falsos positivos (Figura 5e). Los resultados mostraron una mejor resolución y mayor definición de puntos al utilizar 400 µg de proteína total del extracto E6, con un enfoque a 50 000 V y tinción con azul Coomassie (Figura 5f), por lo que estas condiciones fueron utilizadas para comparar los extractos de los seis estadios de maduración.

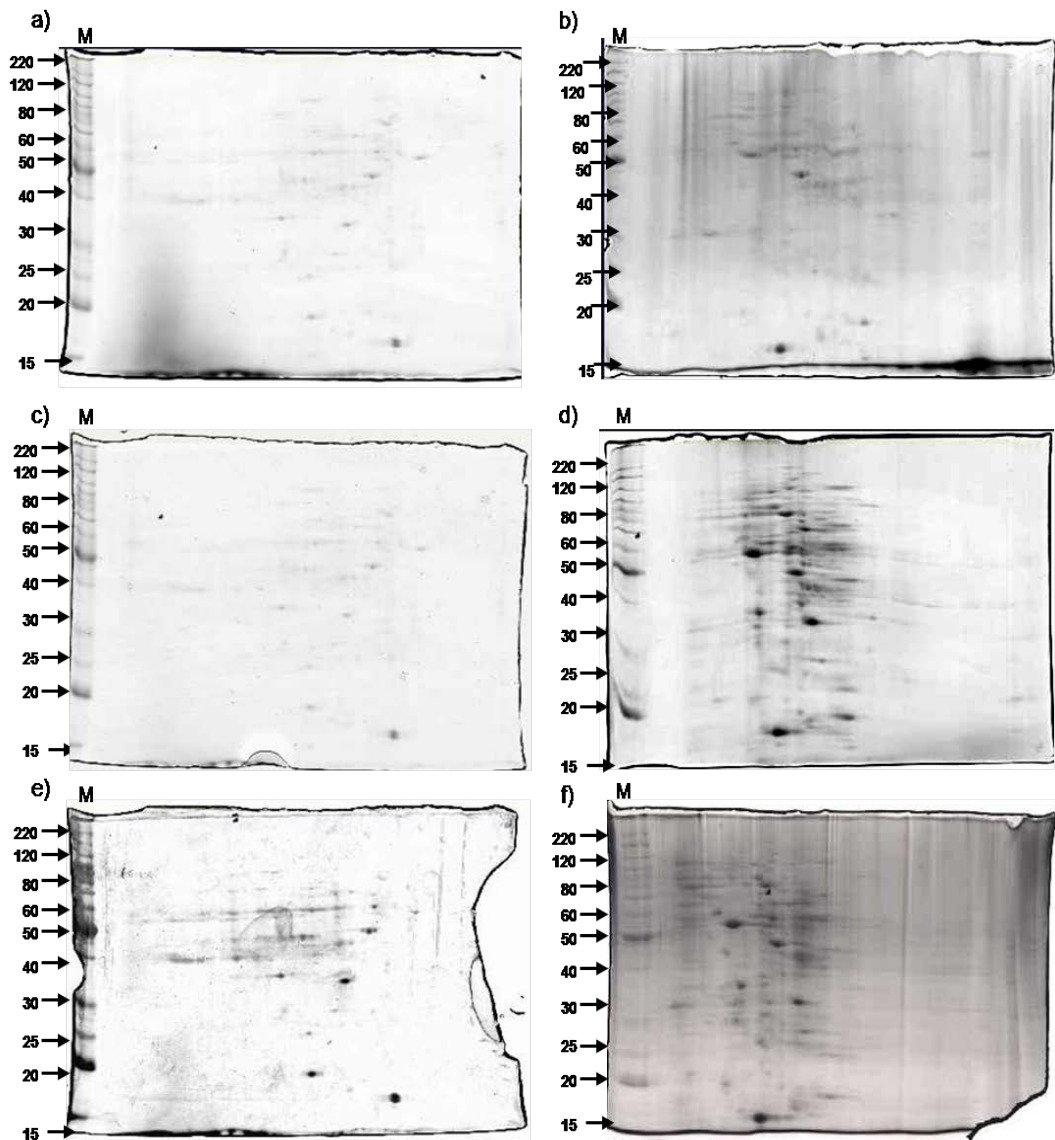


Figura 5. Evaluación de condiciones de isoelectroenfoco y concentración de extractos de proteínas de zarzamora para el desarrollo de la 2-DE. El IEF se llevó a cabo en tiras de IPG de 7 cm, pH 3 a 10. La concentración de proteínas totales del extracto E6 fue de 100 µg (a, c y e), 200 µg (b y d) y 400 µg (f), el enfoque se desarrolló a 40 000 V (a, b y e) y 50 000 V (c, d y f). La tinción se hizo con azul de Coomassie R-250 (a, b, c, d y f) y con plata (e). M, marcador de peso molecular

Análisis preliminar de manchas peptídicas durante el proceso de maduración. Las proteínas totales de cada estadio de maduración (E1 a E6) fueron separadas por electroforesis 2-DE, utilizando las condiciones estandarizadas. Las imágenes obtenidas de cada estadio de maduración fueron editadas manualmente adicionando manchas peptídicas y/o eliminando falsos positivos seleccionados por el programa, que detecta por medio de una escala de grises (Figura 6). Cabe señalar que los puntos eliminados y adicionados correspondieron a un porcentaje menor al 10 % del total de los puntos inicialmente detectados por el programa.

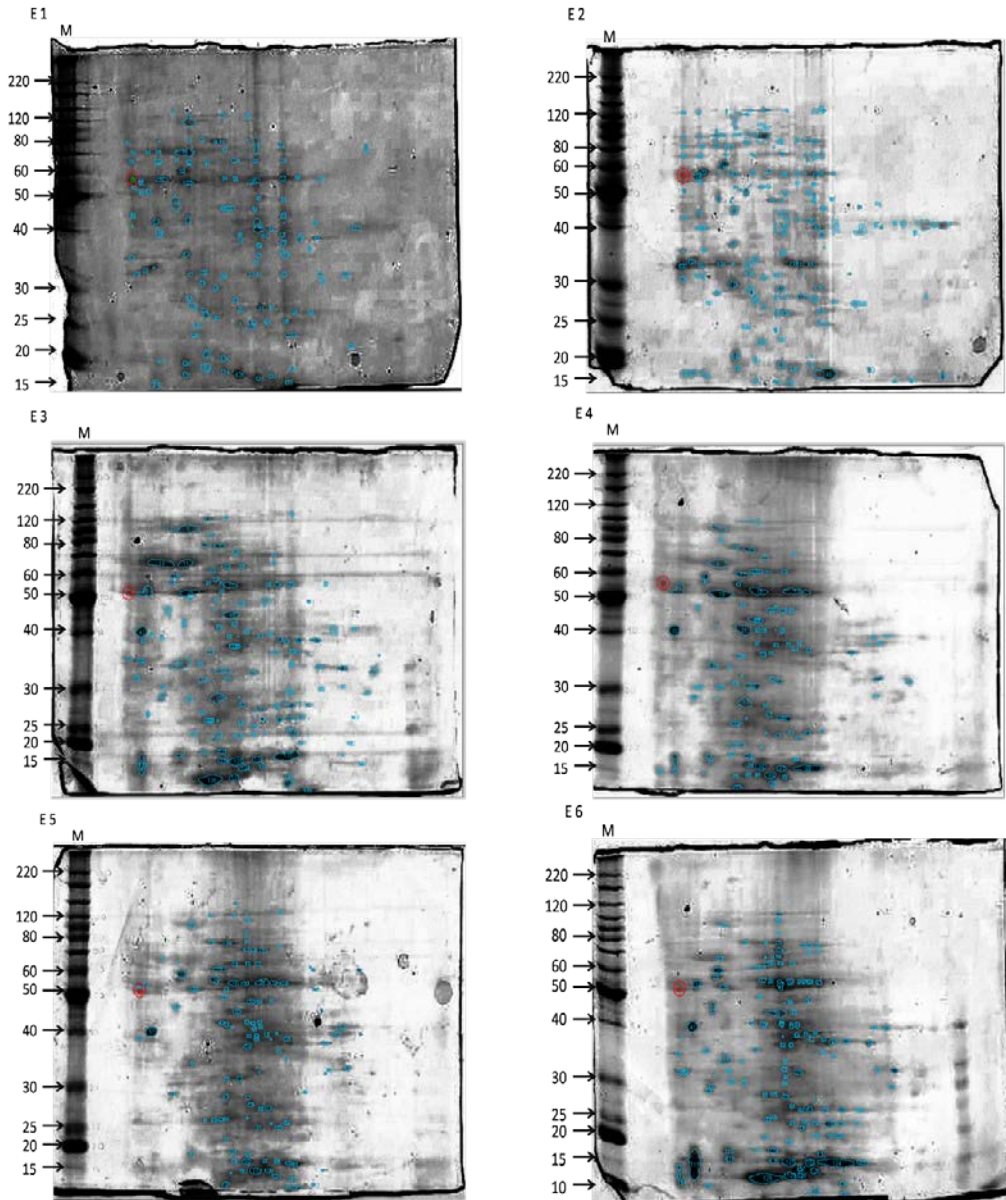


Figura 6. Electroforesis 2-DE de las proteínas de frutos de zarzamora durante seis estadios de maduración. 400 μ g de proteínas totales de cada estadio de maduración fueron separadas por IEF en tiras de IPG de 7 cm, pH 3.0 a 10.0 a 50 000 V durante 24 h y posteriormente en SDS-PAGE al 12 %. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie. Las imágenes se editaron con el programa Kodak MI, versión 4.5. El punto señalado en rojo es el seleccionado como referencia de intensidad 1.0, los puntos en azul son los seleccionados por el programa y editados como fracciones peptídicas. M, marcador de peso molecular.

Una vez que se seleccionaron las fracciones proteicas en las imágenes de los seis estadios de maduración, se cuantificó el total de manchas presentes en cada estadio. El mayor número de manchas proteicas se presentó en E2 (158), que corresponde a frutos con 80 % de drupelas verdes y un 70 % del crecimiento total, mientras que E4; de frutos con 90 % de drupelas rojas y 100 % del crecimiento, mostró 97 puntos, es decir únicamente 61 % del número de puntos encontrados en E2 (Cuadro 1). Sin embargo, el porcentaje de puntos aumentó posteriormente, hasta alcanzar 135 en E6, correspondiente al 85 % del número total de puntos en E2. Estos resultados sugieren una alta expresión de proteínas involucrados en los primeros estadios; además, que un gran número de los péptidos ubicados en E2 podrían corresponder a proteínas involucradas en el crecimiento del fruto y cuya abundancia disminuye al alcanzar un 100 % de

crecimiento, mientras que se comienzan a acumular otros péptidos que podrían corresponder a proteínas relacionadas con cambios independientes al aumento de volumen.

Cuadro 1. Número total de manchas peptídicas en los extractos de cada estadio de maduración.

Estadio	E1	E2	E3	E4	E5	E6
No. de manchas	119	158	140	97	110	135

El análisis de los valores estimados de PM y pI de las manchas peptídicas seleccionadas en cada estadio permitió establecer que, en todos los estadios de desarrollo y maduración, existe un mayor número de péptidos en el intervalo de puntos isoeléctricos de 5.0 a 6.99 y de 30 a 50 kDa (Figura 7). De manera particular, en los estadios E2, E3 y E6 se observa una alta incidencia de manchas peptídicas en estos valores de pI y PM. Los péptidos en E2 están distribuidos en todos los valores de pI y PM, con una abundancia mayor en un pI entre 5.00 a 5.99 y entre 30 a 60 y 80 a 120 kDa, mientras que E6 presenta el mayor número de manchas entre 15 a 20 y 30 a 40 kDa.

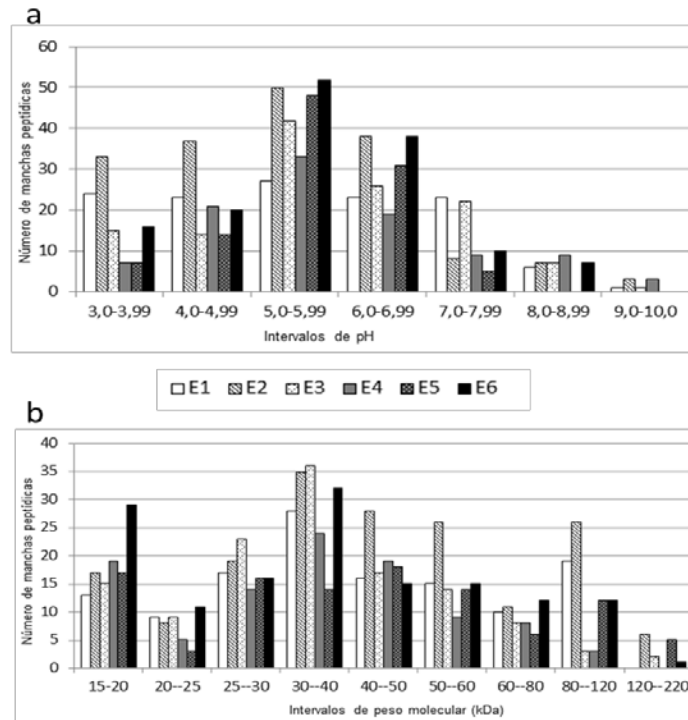


Figura 7. Clasificación de los péptidos de zarzamora durante la maduración por su pI y su PM. Las manchas peptídicas de cada estadio de maduración observadas en los ensayos 2-DE se agruparon de acuerdo a su pI (a) y a su PM (b). E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

Al analizar la distribución de manchas proteicas de pI 5.0 a 6.99, se observó que estos péptidos presentaron una alta incidencia en E2, entre 25 y 60 kDa, mientras que el E6 presentó mayor abundancia en péptidos de 15 a 40 kDa; sin embargo, también hay abundancia en otros estadios en los valores de 20 a 25 y 60 a 80 kDa (Figura 8). Por su parte, al analizar el pI de proteínas más abundantes y con PM de 30 a 50 kDa, se observó que la mayor incidencia de proteínas está entre 5.00 y 6.99 pI, en E2 y E6 se observaron más proteínas (Figura 9).

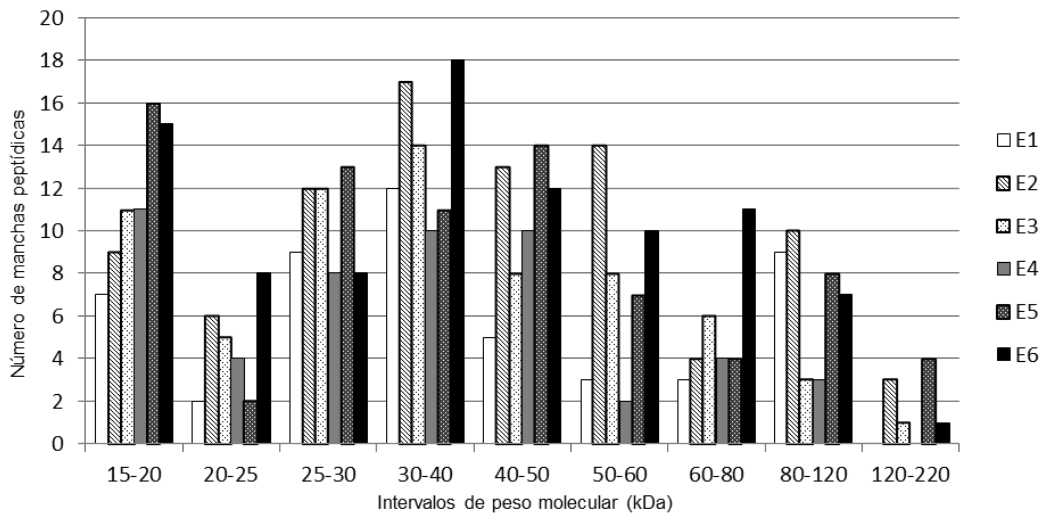


Figura 8. Peso molecular de péptidos de pI 5.0 a 6.9 durante la maduración de zarzamora. Las manchas peptídicas de extractos de zarzamora durante seis estadios de maduración que fueron separadas por los ensayos de 2-DE en un intervalo de pI de 5.0 a 6.9, fueron agrupadas de acuerdo a su peso molecular. E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

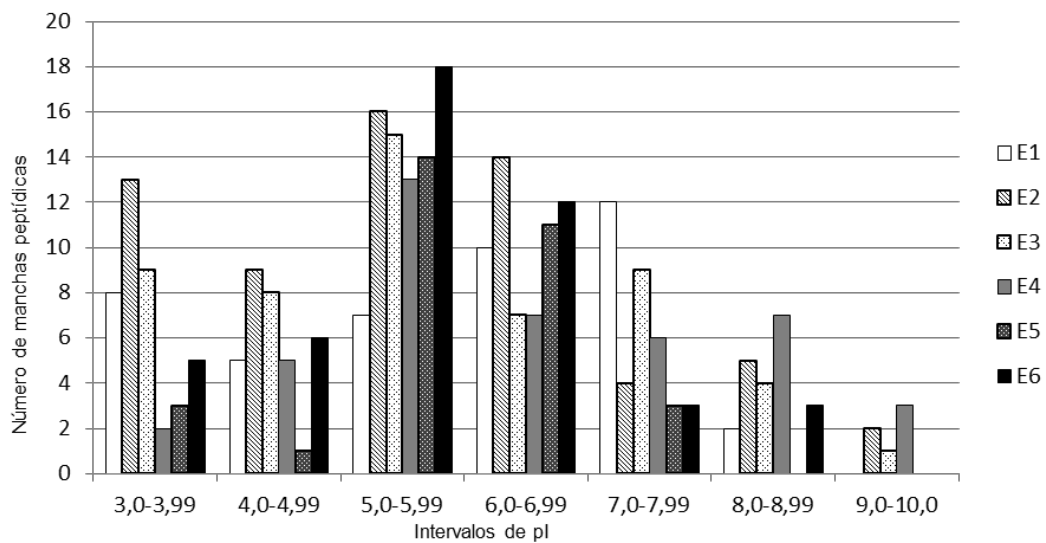


Figura 9. Punto isoelectrico de péptidos de 30 a 50 kDa durante la maduración de zarzamora. Las manchas peptídicas de extractos de zarzamora durante seis estadios de maduración que fueron separadas por los ensayos de 2-DE en un intervalo de 30 a 50 kDa, fueron agrupadas de acuerdo a su pI. E1 a E6 representan los seis estadios de maduración.

La característica fenotípica más sobresaliente del estado E2 de los frutos de zarzamora consiste en un aumento del 30 % en volumen respecto a E1, alcanzando un tamaño similar al de los frutos de estados más avanzados, mientras que el cambio de coloración no varía de manera prominente respecto al E1. Es por ello que los resultados observados sugieren que los péptidos diferenciales y de alta incidencia presentes en E2 y ausentes en E1 (como los observados en un peso molecular entre 25 y 60 kDa) corresponden a proteínas asociadas al crecimiento de los frutos de zarzamora en esta etapa, mientras que los polipéptidos de proteínas asociadas a las características fenotípicas de madurez de cosecha o de consumo observados en el E6 podrían situarse en un peso molecular entre las de PM 20-25 o 60-80 kDa.

En la caracterización preliminar del patrón de expresión de los péptidos observados en las imágenes, se seleccionaron manualmente las manchas con patrones similares de corrida en los seis estadios de maduración, que presumiblemente podrían corresponder a un mismo péptido. Posteriormente se le otorgó un número de identificación a cada péptido y se comparó la intensidad registrada en cada estadio de maduración, de acuerdo a los valores otorgados por el programa KODAK MI versión 4.5.

De esta manera se ubicaron puntos de péptidos presentes en los seis estadios en densidad similar (Figura 10), que sugieren un patrón de expresión constitutiva. Asimismo se ubicaron péptidos que mostraron intensidad disminuida en los últimos estadios respecto a los primeros, que podrían corresponder a proteínas cuya expresión es inhibida durante la maduración de los frutos y péptidos con un patrón de intensidad superior en los últimos estadios respecto a los primeros, que pueden pertenecer a proteínas cuya expresión está asociada a la maduración de los frutos de zarzamora.

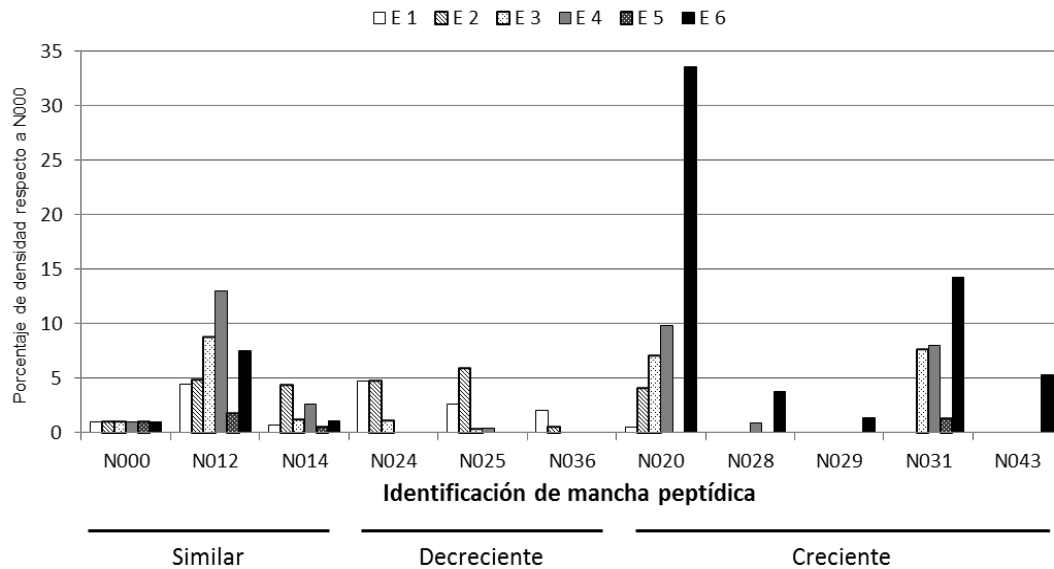


Figura 10. Densidad de péptidos en zarzamora durante la maduración. La densidad de las manchas peptídicas identificadas en los ensayos de 2-DE como comunes respecto a pI y PM fue comparada en los extractos de los seis estadios de maduración (E1 a E6, respectivamente). Se tomó como referencia una mancha común de intensidad similar en todas las imágenes (N000), a la que se le dio un valor de 1.0. En las barras de la base de la gráfica se agrupan los péptidos con densidad similar, decreciente y creciente durante la maduración.

Un gran número de enzimas se encuentran involucradas en el crecimiento y desarrollo de los frutos, por lo que el análisis de presencia de proteínas y su caracterización en cuanto a PM y pI permite estudiar la maduración asociada a caracteres fisiológicos y fenológicos (Faurobert *et al.*, 2007). El tomate es un modelo de estudio de regulación de la expresión génica en el proceso de maduración de frutos climatéricos, en este proceso se han identificado proteínas cuya expresión se incrementa o disminuye durante el proceso de maduración y la función de muchos de ellos se ha relacionado con el aumento en división y expansión celular durante las etapas en las que el fruto crece, o con cambios en textura, color, sabor o acumulación de compuestos aromáticos durante las etapas más avanzadas de la maduración.

Esto ha permitido conocer ampliamente el proceso de maduración en estos frutos, desde el punto de vista metabólico, hormonal y bioquímico de los caracteres que lo conforman (Biggs *et al.*, 1986; Seymour *et al.*, 2008) y algunos procesos podrían extrapolarse a los frutos no climatéricos. Como un primer acercamiento, en el presente trabajo se caracterizó el perfil de péptidos de los frutos de zarzamora durante el proceso de maduración. Se registraron manchas

peptídicas constitutivas, otras cuya presencia se sugiere es inducida durante el proceso y que podrían corresponder a proteínas asociadas a la síntesis de antocianinas, oxidación y/o fermentación descritos para la maduración de otros frutos (Pera; Nilo *et al.*, 2010; Tomate; Faurobert *et al.*, 2007; Uva; Sarry *et al.*, 2004), mientras que otras que se inhiben durante el proceso, en forma similar a lo que sucede con las proteínas involucradas en síntesis de ácidos orgánicos, proteínas o plegamiento de proteínas (Sarry *et al.*, 2004).

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo se permitió el establecimiento de protocolos que permitieron lograr resultados preliminares en el estudio de los patrones de expresión de proteínas de frutos de zarzamora durante el proceso de maduración, sin embargo, es necesario obtener réplicas de estos resultados e identificar la naturaleza de los péptidos cuya expresión se sugiere asociada a este proceso.

CONCLUSIONES

La escala morfológica de maduración de frutos de zarzamora generada en el presente trabajo reconoce seis estadios de maduración en la var. Brazos, definidos por el tamaño y pigmentación de los frutos.

Las condiciones establecidas de IEF permiten comparar la expresión de fragmentos peptídicos durante la maduración con base en concentraciones constantes de proteína total en los distintos estadios.

Los patrones polipeptídicos observados por electroforesis desnaturizante y por electroforesis en dos dimensiones, muestran fragmentos que sugieren expresión constitutiva y diferencial durante la maduración de frutos de zarzamora.

LITERATURA CITADA

- Bianco, L., L. López, A. G. Scalone, M. Di Carli, A. Desiderio, E. Benvenuto, G. Perrotta. 2009. **Strawberry proteome characterization and its regulation during fruit ripening and in different genotypes**. *J Proteomics* 72 (4):586-607.
- Biggs, M., R. Harriman, A. Handa. 1986. **Changes in gene expression during tomato fruit ripening**. *Plant Physiol.* 81:395-403.
- Bolmgren, K. y O. Eriksson. 2010. **Seed mass and the evolution of fleshy fruits in angiosperms**. *Oikos* 119:707-718.
- Bradford, M. M. 1976. **A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding**. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
- Cánovas, F. M., E. Dumas-Gaudot, G. Recorbet, J. Jorin, H. P. Mock, M. Rossignol. 2004. **Plant Proteome Analysis**. *Proteomics* 4: 285-298
- Cantu, D., A. R. Vicente, L. C. Greve, F. M. Dewey, A. B. Bennett, J. M. Labavitch, A. L. T. Powell. 2008. **The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea***. *Proc Natl Acad Sci* 105:859-864.
- Chávez-Franco, S. H., E. Vázquez-García, C. Saucedo-Veloz. 2000. **Propiedades biomecánicas de frutos de zarzamora**. *Agrociencia* 34:329-335.
- Cheng, G. W. y P. J. Breen. 1991. **Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruit**. *J Am Soc Hortic Sci* 116:865-869.
- Esquivel, A. E., G. J. Morales, C. A. L. Ortiz, G. M. V. Rodríguez, V. A. Ronquillo, S. A. C. Sánchez, D. A. R. Rodríguez, M. S. H. Guzmán, L. M. R. Mendoza, L. D. Hernández. 2008. **Análisis de las Propiedades Físicoquímicas de la Zarzamora en las Variedades Brazos, Cherokee y Tupy de la Zona Alta de Michoacán**. Tecnológico de Celaya. Depto. Ingeniería Bioquímica. www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A027.pdf. Consultado el 20 de agosto de 2011.

- Faurobert, M., C. Mihr, N. Bertin, T. Pawlowski, L. Negroni, N. Sommerer, M. Causse 2007. **Major proteome variations associated with cherry tomato pericarp development and ripening**. *Plant Physiol.* 143(3):1327-1346.
- Gambetti, P., L. Autilio Gambetti, S. C. Papasozomenos. 1981. **Bodian's silver method stains neurofilament polypeptides**. *Science.* 213 (4515):1521–1522.
- Görg, A., W. Weiss, M. J. Dunn. 2004. **Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics**. *Proteomics*; 4: 3665–3685.
- Hummer, E. K. 1996. **Rubus diversity**. *HortScience.* 31(2):182–183.
- Inforural, 2010. **Zarzamora detona progreso**. <http://www.inforural.com.mx>. Michoacán. 26 de enero de 2010. Consultado el 18 de noviembre de 2011.
- Jones, C. S., H. V. Davies, M. A. Taylor. 2000. **Profiling of changes in gene expression during raspberry (*Rubus idaeus*) fruit ripening by application of RNA fingerprinting techniques**. *Planta* 211:708-714.
- Laemmli, U. K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature* 227: 680-685.
- Manning, K. 1998. **Isolation of a set of ripening-related genes from strawberry: their identification and possible relationship to fruit quality traits**. *Planta* 205:622–631.
- Manrique Klinge K. 2001. **Nociones del Manejo de Post-cosecha**. Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos. Centro Internacional de la Papa. 1-9 pp.
- Matas, A. J., N. E. Gapper, M.-Y. Chung, J. J. Giovannoni, J. K. C. Rose. 2009. **Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life**. *Curr Opin Biotechnol* 20:197-203.
- Mehta, R. A., T. Cassol, N. Li, N. Ali, A. K. Handa, A. K. Mattoo. 2002. **Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life**. *Nat Biotechnol* 20:613-618.
- Moyano, E., I. Portero-Robles, N. Medina-Escobar, V. Valpuesta, J. Muñoz-Blanco, J. L. Caballero. 1998. **A fruit-specific putative dihydroflavonol 4-reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process**. *Plant Physiol.* 117:711-716.
- Muñoz, R. M. y M. R. Juárez. 1995. **El mercado mundial de la frambuesa y zarzamora**. Chapingo, Mex. http://www.infoaserca.gob.mx/proafex/FRAMBUESA_Y_ZARZA.pdf Consultado el 10 de enero de 2012.
- Neily, M. H., C. Matsukura, S. Bernillon, C. Deborde, A. Moing, Y.-G. Yin, T. Saito, K. Mori, E. Asamizu, D. Rolin, T. Moriguchi, H. Ezura. 2011. **Enhanced polyamine accumulation alters carotenoid metabolism at the transcriptional level in tomato fruit over-expressing spermidine synthase**. *J Plant Physiol.* 168:242-252.
- Nilo, R., C. Saffie, K. Lilley, R. Baeza-Yates, V. Cambiazo, R. Campos-Vargas, M. González, L. A. Meisel, J. Retamales, H. Silva, A. Orellana. 2010. **Proteomic analysis of peach fruit mesocarp softening and chilling injury using difference gel electrophoresis (DIGE)**. *BMC Genomics*, 11:43
- Perkins-Veazie, P., J. K. Collins, J. R. Clark. 1996. **Cultivar and maturity affect postharvest quality of fruit from erect blackberries**. *HortScience* 31:258–261.
- Perkins-Veazie, P., J. R. Clark, D. J. Huber, E. A. Baldwin. 2000. **Ripening physiology in ‘Navaho’ thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes**. *J. Amer Soc Hort Sci* 125:357-363.
- Piña-Dumoulin, G., V. V. C. Saucedo, E. A. Ayala, L. A. Muratalla. 2001. **Atmósferas controladas para combatir daños postcosecha en Zarzamora (*Rubus* sp.)**. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 18: 87-105
- Ramaschandra, G. S., C. Stander, D. Jacobson, B. Ndimba, M. A. Vivier. 2011. **Proteomic analysis of grape berry cell cultures reveals that developmentally regulated ripening related processes can be studied using cultured cells**. *PLoS ONE* 6(2): e14708.doi:10.1371/journal.pone.0014708.
- Robinson, S. P. y C Davies. 2000. **Molecular biology of grape berry ripening**. *Aus J Grape Wine Res* 6:175-188.
- Rosas, C. F. F. 2008. **Proteómica de la maduración de tunas con características contrastantes de maduración**. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. Unidad Irapuato.
- SAGARPA. 2002. **Estadísticas de bayas. Producción de zarzamora en Michoacán**. Departamento de Hortofrutícolas. México D.F. Consultado el 9 de septiembre de 2011.
- SAGARPA. 2009. **Registra México aumento en producción de Zarzamora y Frambuesa, 020/05**, México, D.F. Consultado el 13 de noviembre de 2011.

- Sarry, J.-E., N. Sommerer, F.-X. Sauvage, A. Bergoin, M. Rossignol, G. Albagnac, C. Romieu. 2004. **Grape berry biochemistry revisited upon proteomic analysis of the mesocarp**. *Proteomics* 4: 201-215.
- Seymour, G, M. Poole, K. Manning, G. King. 2008. **Genetics and epigenetics of fruit development and ripening**. *Curr Opin Plant Biol.* 11:58-63.
- SIAP. 2011. **Cierre de la producción agrícola por cultivo**. <http://www.siap.gob.mx>. Consultado el 23 de noviembre de 2011
- SNIIM. 2008. **Sistema Nacional de Información de Mercados**. <http://www.economia-sniim.gob.mx/sicia/VerAgr.htm>. Consultado el 22 de febrero de 2012.
- Srivastava, L. 2002. **Plant growth and development**. Academic Press, San Diego, California. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc. Publ. Sunderland, Massachusetts. 772p.
- Sun, L. Y. Sun, M. Zhang, L. Wang, J. Ren, M. Cui, Y. Wang, K. Ji, P. Li, P. Chen, S. Dai, C. Duan, Y. Wu, P. Leng. 2011. **Suppression of 9-cis-epoxycarotenoid digoxigenase (NCED), wich encodes a key enzyme in abscisic acid biosynthesis, alters fruit texture in transgenic tomatoes**. *Plant Physiol. Preview*. Published on November 22, 2011, as DOI:10.1104/pp.111.186866.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al señor Benjamín Villanueva Esquivel, dueño del huerto comercial “Vara Azul”, por permitirnos utilizar sus materiales. Al Dr. Octavio Paredes López, del CINVESTAV, Unidad Irapuato, por permitirnos utilizar sus instalaciones. Así como al financiamiento de los proyectos PIFI 2007-17-03 y CIC-UMSNH 15.11, 2010.

Dra. Ana Tztzqui Chávez-Bárceñas

Profesora Investigadora de Tiempo Completo. Laboratorio de Interacciones Planta-Ambiente, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. tztzquichavez@gmail.com

Ing. Cristina Alonso-Ojeda

Egresada del programa de Ingeniero Agrónomo con especialidad en Fruticultura, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Dr. Pedro Antonio García-Saucedo

Profesor de Tiempo Completo, Laboratorio de Bromatología, Facultad de Agrobiología “Presidente Juárez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.